

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03797

研究課題名（和文）ゲノム編集ツール臓器内直接送達システムによる生体内ダイレクトゲノム編集技術の開発

研究課題名（英文）Development of in vivo direct genome editing technology by direct delivery of genome editing tool into organs

研究代表者

小暮 健太郎（KOGURE, Kentaro）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学域）・教授

研究者番号：70262540

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ゲノム編集ツールCRISPR-Cas9複合体（リボヌクレオプロテインRNP）を標的臓器細胞内へ直接送達可能な新規物理的送達システム開発による生体内ダイレクトゲノム編集技術の確立を目的とした。研究代表者は、微弱電流による皮内薬物送達技術（イオントフォレシスItP）を用いた体内臓器表面からのin vivoダイレクトゲノム編集を発想した。だが巨大なRNPのItPには、臓器細胞内送達の技術革新が必須なため、本研究ではRNPの臓器内浸透、細胞内取込とエンドソーム脱出の達成によるダイレクトゲノム編集技術の開発を目指した。種々検討の結果、Cas9が細胞質送達されることによるゲノム切断を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集技術は、食物改良や遺伝子治療技術として注目されている。特にCRISPR-Cas9は、ゲノム編集に汎用され、アデノ随伴ウイルスAAVや脂質ナノ粒子キャリアーLNPを用いたゲノム編集が検討されている。しかし、AAVに搭載可能な遺伝子サイズは限られ、安全面での問題もある。一方、LNPは血流を介した肝臓送達には利用可能だが、それ以外の臓器送達は困難である。すなわち、担体を用いずCRISPR-Cas9を標的臓器細胞に直接導入可能な革新的技術が必要である。本研究は、皮内薬物送達技術ItPを臓器細胞内へのゲノム編集ツール送達に展開することで、ゲノム編集への新たなオプション提供という意義を有する。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish in vivo direct genome editing technology by developing a novel physical delivery system that can directly deliver the genome editing tool CRISPR-Cas9 complex (ribonucleoprotein RNP) into target organ cells. The principal investigator conceived of in vivo direct genome editing by intradermal drug delivery technology (iontophoresis ItP) using a weak electric current from the skin surface. However, the ItP of large RNPs requires innovation in organ and intracellular delivery, so this study aimed to complete the direct genome editing technology by achieving organ penetration, intracellular uptake, and endosomal escape of RNPs. As a result of various studies, we were able to confirm that the genome was cleaved by delivery of Cas9 to the cytoplasm.

研究分野：薬物送達学

キーワード：イオントフォレシス ゲノム編集 微弱電流処理

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム編集技術は、漁業・農業において様々な食物の改良に用いられているが、医療においても遺伝子治療技術として注目され、最近盛んに研究されている。特に細菌のウイルス防御システムを哺乳類細胞に応用した技術である **Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) - CRISPR-associated nuclease (Cas9)** は、その簡便さと効率の高さからゲノム編集に汎用され、2020年のノーベル化学賞の受賞対象となった。研究開始当初、世界において進行中の **CRISPR-Cas9** を用いたヒト臨床試験は29件あり、 β サラセミアや非ホジキンリンパ腫などの治験が行われていた (ClinicalTrials.gov)。多くは、患者から取り出した細胞に、体外で **CRISPR-Cas9** システムを導入することでゲノム編集を行い、再び体内に戻すものであるが、一部にはアデノ随伴ウイルス (**AAV**) ベクターや脂質ナノ粒子キャリアーを用いた **in vivo** ゲノム編集も試みられていた ([Sanches-da-Silva GN 他 Int J Genom 2019\(2019\)8458263](https://doi.org/10.1093/ibd/ibz126))。しかし、**AAV** ベクターに搭載できる遺伝子サイズが4.7kb以下と限られるだけでなく、血中投与および筋肉内注射した **AAV** ゲノムのヒトゲノムへの挿入変異による造腫瘍性や免疫原性など安全面での問題が指摘されていた ([Wan T 他 J Control Release 322\(2020\)236-247](https://doi.org/10.1038/s41591-020-0826-4))。一方、脂質ナノ粒子キャリアーは血流を介して肝臓へのデリバリーには使えるが、それ以外の臓器への送達は困難であった。これら従来技術による問題は、ベクター・キャリアーを用いるが故に起こるため、それらを用いずとも安全で効率的な新しい技術が求められた。すなわち、標的となる臓器表面から細胞内までベクター・キャリアーを用いず、**CRISPR-Cas9** を直接導入できる革新的な技術が必要であった。研究代表者は、微弱電流による皮内薬物送達技術イオントフォレシス (**ItP**) がその技術になり得ると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、ゲノム編集ツール **CRISPR-Cas9** 複合体 (リボヌクレオプロテイン **RNP**) を標的臓器細胞内へ直接送達可能な新規物理的送達システムの開発による安全で効率的な生体内ダイレクトゲノム編集技術の確立を目的とした。研究代表者は、皮膚表面から微弱電流による皮内薬物送達技術 (イオントフォレシス **ItP**) により、皮膚のみならず肝臓表面からの直接的な **siRNA** 送達による遺伝子発現抑制に成功したことで、**ItP** による **in vivo** ダイレクトゲノム編集を発想した。だが巨大な **RNP** の **ItP** には、臓器・細胞内送達の技術革新が必須なため、本研究では **RNP** の臓器内浸透、細胞内取込とエンドソーム脱出の達成により、**in vivo** ダイレクトゲノム編集技術を確立し、疾患モデルでの治療効果の検証から本システムの開発を目指した。

3. 研究の方法

初年度には、**RNP** の微弱電流による細胞内送達とゲノム編集の検討 (**in vitro**)、イオントフォレシスにおける安全性の検証 (**in vivo**)、腹腔内視鏡型 **ItP** デバイスの構築と肝臓表面 **ItP** による組織内送達の検証 (**in vivo**)、を実施した。2年目には、肝臓表面 **ItP** による臓器内核酸医薬送達メカニズムの検討 (**in vivo**)、**RNP** の微弱電流による細胞内送達とゲノム編集の詳細な条件検討 (**in vitro**)、**CRISPR** の **ItP** による肝臓内送達の検証 (**in vivo**)、を実施した。最終年度は、本課題の肝となる **RNP** の微弱電流によるゲノム編集の詳細な条件検討 (**in vitro**)、を実施した。

4. 研究成果

初年度は、培養細胞に **RNP** 存在下で微弱電流処理を行った後、**T7E1** アッセイを行ったところ、市販試薬の場合よりも薄いバンドが確認され、さらにエンドソーム破壊薬のクロロキン共存下では市販試薬と同じ程度の低分子バンドが確認できた。また、肝臓表面 **ItP** 後の血中 **ALT/AST** を定量評価することで、**ItP** による肝臓ダメージが無いことが確認された。さらに、プラスチックセルスクレイパーにヒト心電図電極とファイバースコープを固定した **ItP** デバイスを試作し、動物腹部皮膚に小さい穴を開けて挿入した後、**siRNA** を用いて肝臓表面で **ItP** を実施した。その結果、効率は高くはなかったが標的遺伝子の **mRNA** 量を低下させることができた。2年目には、**ItP** によって肝臓組織細胞の細胞骨格が、皮膚細胞と同様に変化するのかが調べるため、**ファロイジン** を用い **ItP** 処理したマウス肝臓切片の重合化アクチンを染色したところ、**ファロイジン** 蛍光が減少したことから、皮膚と同様に微弱電流によって重合化アクチンの脱重合促進が確認できた。また、微弱電流処理48時間後に **T7E1** アッセイを行いゲノム編集を評価したところ、クロロキン共存下で切断バンドと思われるものが得られたが、毒性も見られたため、クロロキン濃度と処理時間、評価時間を詳細に検討した。さらに、蛍光標識 **CRISPR** を用い、肝臓表面で **ItP** を実施し、肝臓切片の共焦点レーザー顕微鏡観察により **ItP** による肝臓内への **CRISPR** タンパク質の送達を確認した。最終年度は、これまで微弱電流処理48時間後に **T7E1** アッセイを行いゲノム編集を評価したところ、クロロキン共存下で切断バンドと思われるものが得られていたが、明確ではなかったため、細胞から回収した **DNA** をポリアクリルアミド電気泳動後に切り出したバンドから精製したものをを用いて、検討を行った。また、細胞を微弱電流処理す

る時に RNP を存在させておくと、電極に RNP が引き寄せられ、細胞内に取り込まれていない可能性が考えられたため、微弱電流処理後に細胞に添加する方法に変更した。その結果、RNP を存在させることで、スメアなバンドが見られたことから、少なくとも Gas9 が細胞質まで送達されることで、ゲノムが切断できていることを確認することができた。本年度で本科研費は終了するが、引き続き本課題を継続し、詳細な条件検討を行うことでダイレクトゲノム編集技術を確立したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hasan Mahadi, Khatun Anowara, Kogure Kentaro	4. 巻 14
2. 論文標題 Iontophoresis of Biological Macromolecular Drugs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 525 ~ 525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics14030525	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hasan Mahadi, Fukuta Tatsuya, Inoue Shinya, Mori Hinako, Kagawa Mayuko, Kogure Kentaro	4. 巻 343
2. 論文標題 Iontophoresis-mediated direct delivery of nucleic acid therapeutics, without use of carriers, to internal organs via non-blood circulatory pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 392 ~ 399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2022.01.052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小暮健太郎、井上慎也、福田達也、Hasan Mahadi
2. 発表標題 イオントフォレシスによる核酸医薬の肝臓内送達
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kogure K, Fukuta T, Inoue S, Hasan M
2. 発表標題 Iontophoresis-mediated direct delivery of nucleic acid therapeutics to internal organs via non-blood circulatory pathways
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第7回年会(Premium oral session) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上慎也、Hasan Mahadi、福田達也、小暮健太郎
2. 発表標題 イオントフォレシスを用いて体内臓器へ直接送達したsiRNAの遺伝子発現抑制効果
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会 第21回夏期セミナー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉村友佑、井上慎也、Hasan Mahadi、福田達也、小暮健太郎
2. 発表標題 イオントフォレシスによる核酸医薬の肝臓局所的な送達
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会第22回シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上慎也、Hasan Mahadi、福田達也、小暮健太郎
2. 発表標題 経皮薬物送達技術イオントフォレシスを用いた肝臓内へのsiRNA送達
3. 学会等名 第39回 日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小暮健太郎
2. 発表標題 進化したイオントフォレシスによるデリバリー
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会第21回夏期セミナー
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	南川 典昭 (MINAKAWA Noriaki) (40209820)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授 (16101)	
研究分担者	野村 渉 (NOMURA Wataru) (80463909)	広島大学・医系科学研究科(薬)・教授 (15401)	
研究分担者	福田 達也 (FUKUTA Tatsuya) (90805160)	和歌山県立医科大学・薬学部・講師 (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------